

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

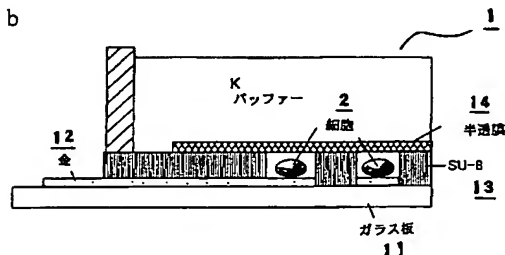
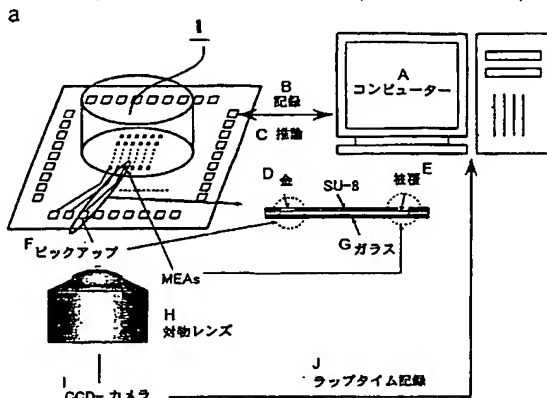
(10) 国際公開番号
WO 2004/018617 A1

- (51) 国際特許分類: C12M 3/00, 1/12, 1/34
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010759
(22) 国際出願日: 2003年8月26日 (26.08.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願2002-245903 2002年8月26日 (26.08.2002) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 安田 賢二 (YA-SUDA, Kenji) [JP/JP]; 〒135-0052 東京都江東区潮見2-8-1 4-1 0 1 4 Tokyo (JP).
(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都港区南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山ビルディング7F Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): CN, US.
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: MICROCHAMBER FOR NERVE CELL CULTURE

(54) 発明の名称: 神経細胞培養マイクロチャンバー



- A...COMPUTER
B...RECORDING
C...PRESUMPTION
12...GOLD
E...COATING
F...PICK UP
G...GLASS
H...OBJECT LENS
I...CCD CAMERA
J...LAP TIME RECORDING
K...BUFFER
2...CELL
14...SEMIPERMEABLE MEMBRANE
11...GLASS PLATE

(57) Abstract: A microchamber for culturing nerve cells which comprises cell-sized electrode arrays located on a transparent glass substrate, microchamber arrays of 10 μ m or more in thickness for aligning cells provided thereon, and a semipermeable membrane, which has such a pore size that the cells cannot pass therethrough and is optically transparent to focused beam, provided on the microchamber to coat it thereby blocking the leakage of the cells from the chamber. This microchamber is further provided with a means of allowing the replacement of a solution in the solution replacing unit, wherein a culture liquor is circulated, on the upper face of the semipermeable membrane; a means of optically monitoring changes in the conditions of the cells in the microchamber arrays; and a means of continuously measuring potential changes in each nerve cells. To clarify the learning process of cells, changes in stimulus responses are measured over a long time while completely controlling the network system and preventing the invasion with bacteria, etc.

(57) 要約: 透明なガラス基板上に、細胞レベルの大きさの電極アレイと、その上に厚さ10 μ m以上の肉厚の細胞配列用マイクロチャンバアレイと、さらに前記マイクロチャンバー上面にはチャンバー内から細胞が出ないようにその上面を被覆する細胞が通過できない程度の目の粗い前記集束光に対して光学的に透明な半透膜から構成され、また、前記半透膜の上面は培養液が循環する溶液交換部液交換を可能とする手段を有し、さらに、光学的に前記マイクロチャンバアレイ内の細胞の状態変化を連続観察する手段と、各神経細胞の電位変化を連続計測する手段と組み合わせる手段を有する神経細胞培養マイクロチャンバーであり、細胞の学習過程を明らかにするため、ネットワーク形状を完全に制御しながら、神経ネットワークの刺激応答の変化を、バクテリア等の侵入無しに長期間に渡って計測する手段とする。



2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

神経細胞培養マイクロチャンパー

技術分野

この出願の発明は、細胞の状態を顕微鏡観察しながら、1細胞単位で神経細胞を培養し、かつ、同時に電位変化を計測することのできる、新しい神経細胞培養マイクロチャンパーに関するものである。

背景技術

神経科学の進歩は目覚しく、脳機能の解明のために光、磁場、化学物質などを利用したさまざまな手法が開発され研究に用いられている。特に、高度な情報処理能力については *in vivo* でその機能を明らかにすることが一般的であるが、神経回路網の複雑さゆえに、安定したサンプル状態の維持、サンプル条件の再現性などを完全に揃えることは不可能に近い。そのため、人工的に少数の神経細胞からなる比較的単純な神経回路網を構築し、完全に制御した環境下で細胞ネットワークが情報処理機能を明らかにしようとする研究も盛んに行われている。たとえば、Dichter, M. A. Brain Res., 149, 279-293 (1978) や、Mains R. E., Patterson P. H. J. Cell. Biol., 59, 329-345 (1973)、あるいは、Potter S. M., DeMarse T. B., J. Neurosci. Methods, 110, 17-24 (2001)、そして、Jimbo Y., Tateno T., Robinson H. P. C., Biophys. J. 76, 670-678 (1999) などの研究である。

神経細胞を1つ1つを最小構成単位とする情報処理モデルの計測のために重要なものは、多点同時計測技術と、細胞ネットワークパターンの制御技術であるが、神経細胞の活動電位計測技術も初期の段階では、パッチクランプ法などの細胞に損傷を与える手法が主だったため、同時に3点以上の多点で計測できない、計測を開始してから数時間で測定し

ている細胞が死んでしまうといった問題点があったが、近年、電極アレイ (MEAS) 基板上での神経細胞の培養計測法が開発されることで上記の問題点を克服して数週間に及ぶ長期培養も可能となっている。

他方、神経細胞のネットワークパターンを化学的、あるいは物理的な手法を用いて制御する技術についても古くから多くの研究がなされている。たとえば、化学的方法では、Letourneau 達が神経細胞を培養する基板表面にラミニンなどの細胞接着性の基質でパターンを描き、神経突起をパターンに沿って伸展させることに成功している。これについては、たとえば、Letourneau P. C. : Dev. Biol., 66, 183-196 (1975) による報告がある。物理学的方法では、基板表面に神経細胞の伸展によって障壁となる段差を構築した基板上で培養することで、障壁の高さが $10\ \mu\text{m}$ 程度以上であれば神経細胞の伸展・移動を制限することが可能という報告がある (Stopak D. et al. : Dev. Biol., 90, 383-398 (1982), あるいは Hirono T., Torimitsu K., Kawana A., Fukuda J., Brain Res., 446, 189-194 (1988) など)。

しかしながら、上記従来技術で発明されている電極アレイ基板技術では、基板上に立体障害を持たないため細胞の空間配置を完全に制御することは難しかった。また、上記従来技術の立体構造を用いて細胞の空間配置を制御する場合には、循環する培養液等の外界からのバクテリア等の侵入を防ぐことは難しかった。

この出願の発明は、以上のような従来技術の問題点を解消し、細胞の学習過程を明らかにするため、ネットワーク形状を完全に制御しながら、神経ネットワークの刺激応答の変化を、バクテリア等の侵入無しに長期間に渡って計測することのできる新しい技術手段を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第1には、基

板上に、神経細胞の電位変化を計測するための複数の電極パターンと、その上に、神経細胞を特定の空間配置の中に閉じ込めておくための複数の区画壁とを有し、区画壁の上には、光学的に透明な半透膜が配置されていることを特徴とする神経細胞培養マイクロチャンバーを提供する。すなわち、より具体的には、たとえばこの出願の発明の神経細胞培養マイクロチャンバーは、透明なガラス基板上に、細胞レベルの大きさの電極アレイと、その上に厚さ $10\mu\text{m}$ 以上の肉厚の細胞配列用マイクロチャンバアレイと、さらに前記マイクロチャンバー上面にはチャンバー内から細胞が出ないようにその上面を被覆する細胞が通過できない程度の目の粗い前記集束光に対して光学的に透明な半透膜から構成される。

そして、この出願の発明は、上記第1の発明について、第2には、電極パターンは、光学的に透明な電極であることや、第3には、電極パターンは独立して計測することができる電極数が3個以上であること、第4には、複数の区画壁で隔てられる細胞培養の領域が3以上であること、第5には、上記各電極と各領域が1対1対応であることを特徴とする神経細胞培養マイクロチャンバーを提供する。

この出願の発明の神経細胞培養マイクロチャンバーでは、さらにまた、前記半透膜の上面は培養液が循環する溶液交換部液交換を可能とする手段を有する。また、光学的に前記マイクロチャンバアレイ内の細胞の状態変化を連続観察する手段と、各神経細胞の電位変化を連続計測する手段と組み合わせる手段を有する。

図面の簡単な説明

図1は、この出願の多電極アレイ長期培養顕微観察系の基本構成を例示した模式図である。

図2は、多電極アレイとマイクロチャンバの顕微鏡写真である。

図3は、半透膜の基板接着手順の概念図である。

図4は、多電極アレイチップの外観の顕微鏡写真である。

図 5 は、多電極計測ユニットの概要と装置の外観の写真である。

図 6 は、計測・観察用長期培養顕微鏡システムの外観の写真である。

図 7 は、多電極アレイチップ上のラット小脳顆粒細胞を示す顕微鏡写真である。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下のその実施の形態について説明する。

たとえば添付した図面の図 1 は、この出願の発明の神経細胞マイクロチャンパーを用いた多電極アレイ長期培養顕微観察系の一例を示したものである。図 1 (a) のように、このシステムの心臓部である多電極アレイチップ (1) は、顕微鏡観察系にセットされ、光学系から CCD カメラを通じて制御用コンピュータへのラップタイム計測と、電極アレイからの電気信号の記録および各電極アレイ端子から細胞への電気刺激が可能となっており、電気信号と光学データとの同時計測・記録が可能となっている。

図 1 (b) は、このシステムの心臓部である多電極アレイチップ (1) の一例の一部断面を描いたものである。100 倍の対物レンズでの観察が可能な 0.18 mm の肉薄のスライドガラス (11) 上に、まず電極 (12) アレイの層が配置されている。次に、層の厚さが 25 μ m となるように粘度を調整した光硬化性樹脂 SU-8 (エポキシ系高分子で、光照射によって光が当たった部分が重合する肉厚フォトレジスト材料: Micro Chem Inc. 製、USP 4882245) で電極面を被覆すると同時に、局所的にこの樹脂層をエッチングで除去することで、区画壁 (13) を形成して細胞 (2) を封入する穴 (マイクロチャンバアレイ) を構成している。もちろん前記の SU-8 以外にも、光硬化性であって、比較的肉厚のあるレジスト材料であれば各種の樹脂が使用されてよいことは言うまでもない。

そして、ここで、細胞（２）が封入される金電極（１２）表面にはラミニンやコラーゲンなどが塗布されている。細胞（２）を封入したマイクロチャンバレイの上面には、外部からのコンタミネーションを防ぐと同時に細胞（２）の逃亡を防ぐために、半透膜（１４）で蓋がされている。チップ上の培養液バッファは常に循環しており新鮮な状態が保たれている。この例では金電極を用いたが、ITOなどの光学的に透明な電極を用いてもよい。

次に、多電極アレイチップについて詳しく紹介する。図２に加工の各段階における基板の状態の顕微鏡写真を示した。図２の各写真右下のメジャーバーは長さ $100\mu\text{m}$ である。図２（ａ）は、スライドガラス基板上に、Cr 100\AA 、Au 1000\AA の順で蒸着した後、フォトレジスト剤塗布、露光、現像、エッチングの工程を経て作成した電極パターンである。電極の大きさはこれと組み合わせるマイクロチャンバのサイズに合わせて一辺 $30\mu\text{m}$ とした。図２（ｂ）は、前記の光硬化性樹脂SU-8をスライドガラス基板に塗布乾燥後に希望するパターンの露光、エッチング処理を行うことで作成したマイクロチャンバレイである。この例では、図２（ａ）の電極の位置に合わせて、一辺 $30\mu\text{m}$ の壁を８個配置している。SU-8の壁の高さは $25\mu\text{m}$ （段差計にて測定）であり、図からもわかるようにマイクロチャンバレイの壁の幅は $1\sim 5\mu\text{m}$ 程度であった。このようにSU-8を用いることで簡単に（高さ／幅）の比の高い構造物を作成することができる。図２（ｃ）は、実際に図２（ａ）の電極と、図２（ｂ）のマイクロストラクチャを組み合わせたもので、実施例としての神経細胞の培養にはこの形状の多電極アレイチップを用いた。

次に、多電極アレイチップ上面をカバーする半透膜の蓋の固定方法の手法の一つについて簡単に紹介する。図３に、基板（１１）表面へのビオチン修飾方法と半透膜へのアビジン修飾方法の手順を簡単に示した。まず、基板（１１）表面にアミノ基を付加し、これにエポキシ基を末端

に導入したビオチンを反応させた。他方、半透膜（１４）は、たとえばセルロースからなるため、この糖の五員環の一部を開裂させて、これとアビジン末端に付加したアミノ基を反応させてアビジン修飾半透膜を作成した。半透膜（１４）と基板（１１）は、アビジン- ビオチン結合によって接着固定した。

なお、前記の光硬化性樹脂ＳＵ－８を使用する場合には、ＳＵ－８が反応性のエポキシ基を有していることから、光照射の前にプレベークした基板（１１）表面とタンパク質のアミノ基を反応させ、その後光照射するか、あるいは、ＳＵ－８でパターンを作成した後に、ＳｉＯ₂をその表面にスパッタリングでコートし、その上にシランカップリングでエポキシ基を付加し、これにタンパク質のアミノ基を共有結合させることができる。

図４（ａ）はこのようにして作成した多電極アレイチップの全体像を示した顕微鏡写真である。メジャーバーの長さは１５０μｍである。また図４（ｂ）は、この多電極アレイチップのスライドガラス基板をホルダーに固定した写真である。このスライドガラスの大きさは３ｃｍ×３ｃｍである。実際に培養、観察するときには、この図４（ｂ）で示したホルダーごと、顕微鏡ステージに取り付けた多電極１次アンプに載せて計測を行う。

次に、多電極アレイチップを載せて計測・培養を実際に行うシステムについて以下に簡単に説明する。図５に例示したのは、神経細胞に実際に刺激を与えたり、細胞の発火を電氣的に計測するシステムの概略である。本装置の特徴は、多電極アレイ内に配置した同一電極で細胞に刺激を与えたり計測することが可能であること、光学的に細胞ネットワーク形態を連続観察できること、そして細胞と情報記録装置とは光学的な接続によって、１次アンプ内において接地レベルで絶縁されていることである。したがって長期培養しているときであっても、接地を通じてスパイク信号が細胞に及ばないようにされている。図５（ａ）はこのシステ

ムの概略図であり、この装置の1次アンプ部の写真が図5(b)である。図5(b)で示した1次アンプ基板の中心部は顕微鏡観察のため空けられており、直接顕微鏡のステージ上にセットされる。実装基板は4層多層基板を用い、最上層と最下層は接地面とし、また、これらの接地面先に述べたように、内側と外側で互いに独立させてあり、細胞側は電池駆動、制御用コンピューター側は電源装置駆動としている。本試作機は、試作のため12チャンネル型となっているが、実装密度を上げることで更に多チャンネルとすることが可能である。

図6は、多電極アレイチップを載せて培養する顕微鏡システムを例示したものである。図6(a)は、顕微鏡システムのステージ上に固定された1次アンプ基板と、その基板上に固定されたチップを示した写真である。飽和蒸気圧の5%CO₂含有空気は37℃に暖められて直接基板上のチップに吹き付けられる。この写真では、培養液の還流系が取り付けられていないが、培養時には2本のSUS細管によって培養液を置換しながら連続培養する。また、図6(b)にあるように、顕微鏡システム全体を恒温槽で包み、顕微鏡を含めてシステム全体の温度が一定になるように工夫がされている。

図7は、実際にラット小脳顆粒細胞を、本システムで培養した結果の1例を、対物40倍レンズで撮った画像として示したものである。マイクロチャンバアレイに封入した細胞は、チャンバから逃れることなく、ネットワークを形成しているのが観察された。また、大腸菌等の環境からの不純物の混入も観察されていなかった。これらのことから、マイクロチャンバの構造は、期待された性能を発揮していることがわかる。

もちろん、この出願の発明は以上の例示によって限定されることはない。その細部の形態は様々に可能であることは言うまでもない。

産業上の利用可能性

以上記述したように、この出願の発明を用いることにより、神経細胞

のネットワーク空間配置を 1 細胞単位で制御しつつ、長期培養しながら、その形態変化、電気的特性の変化を連続的に計測することが可能となる。

請求の範囲

1. 基板上に、神経細胞の電位変化を計測するための複数の電極パターンと、その上に、神経細胞を特定の空間配置の中に閉じ込めておくための複数の区画壁とを有し、区画壁の上には、光学的に透明な半透膜が配置されていることを特徴とする神経細胞培養マイクロチャンバー。
2. 電極パターンは、に光学的に透明な電極であることを特徴とする請求項1項の神経細胞培養マイクロチャンバー。
3. 電極パターンは、独立して計測することができる電極数が3個以上であることを特徴とする請求項1または2の神経細胞培養マイクロチャンバー。
4. 複数の区画壁で隔てられる細胞の領域が3領域以上であることを特徴する請求項1の神経細胞培養マイクロチャンバー。
5. 電極パターンと複数の区画で隔てられる領域について、各電極と各領域が1対1対応であることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかの神経細胞培養マイクロチャンバー。

図 1

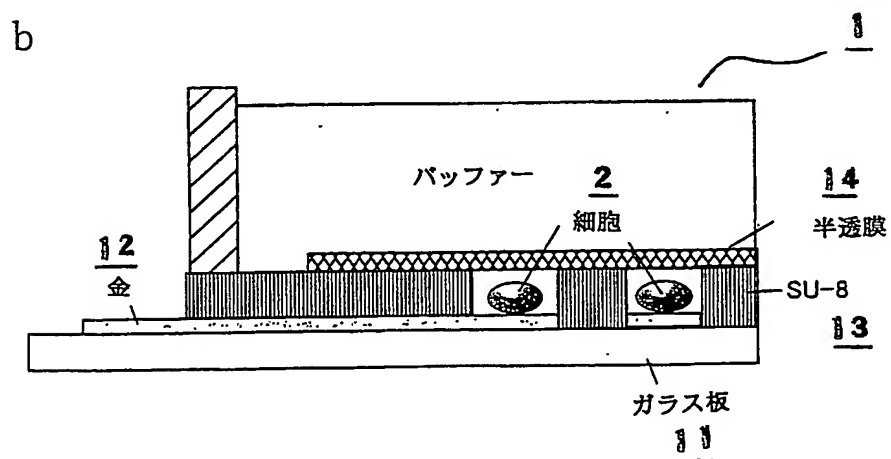
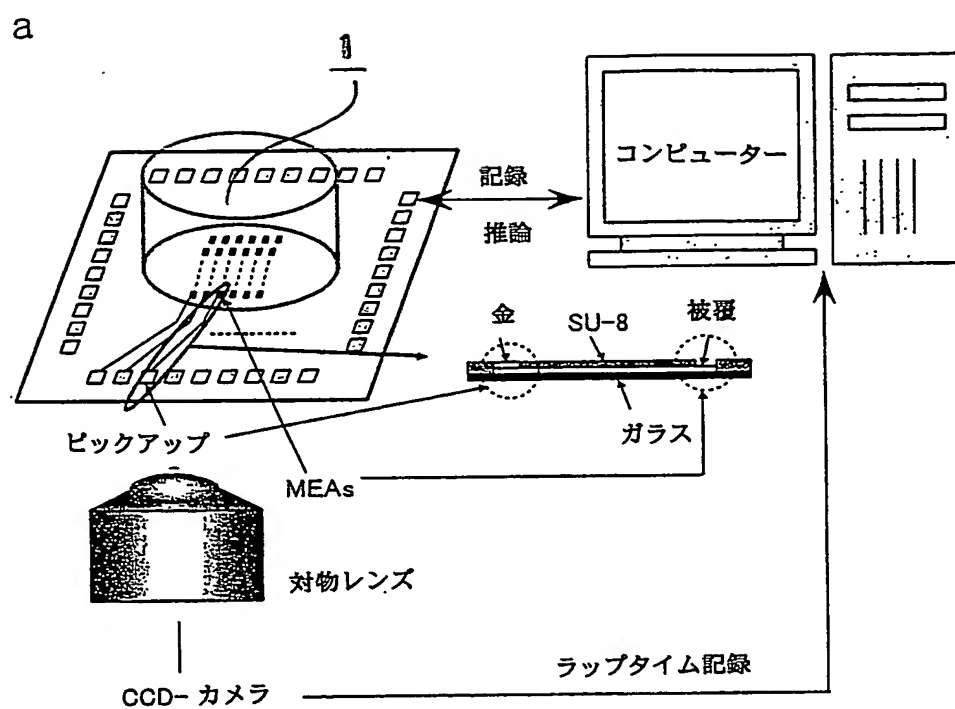
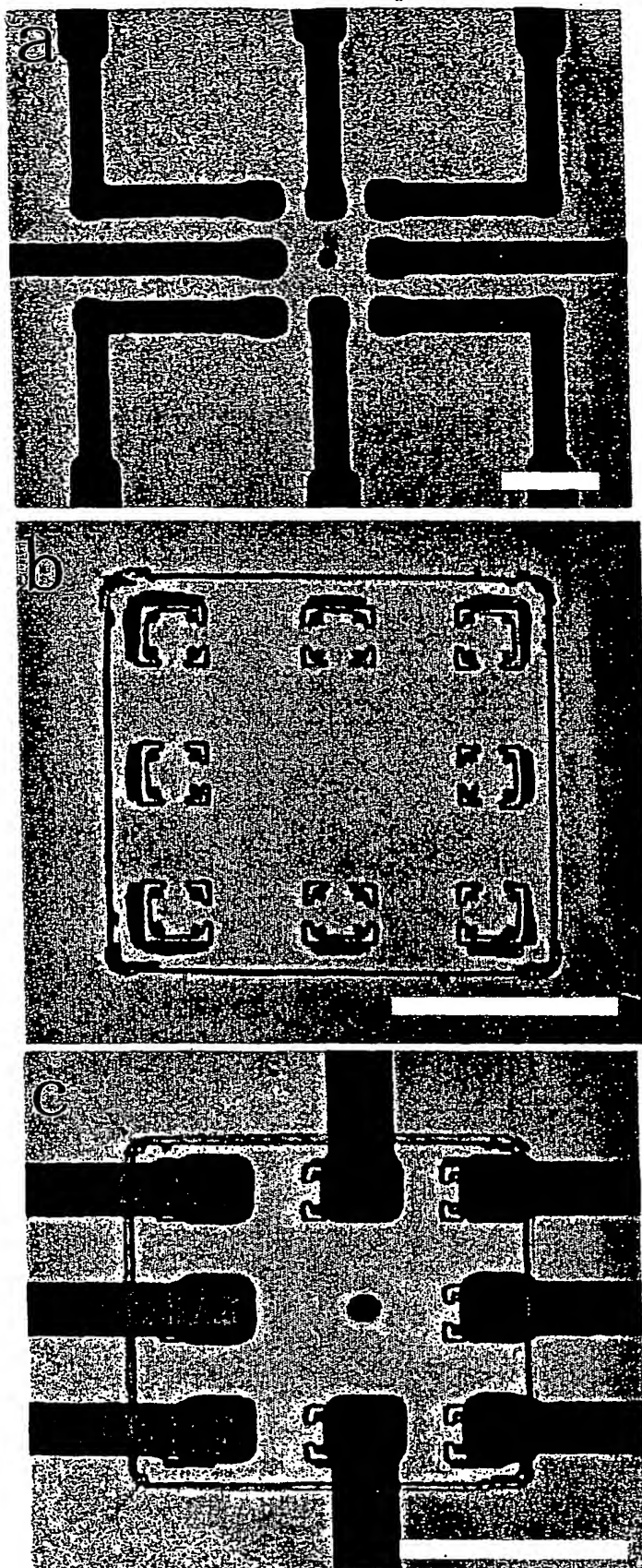


図 2



2/7

差替え用紙(規則26)

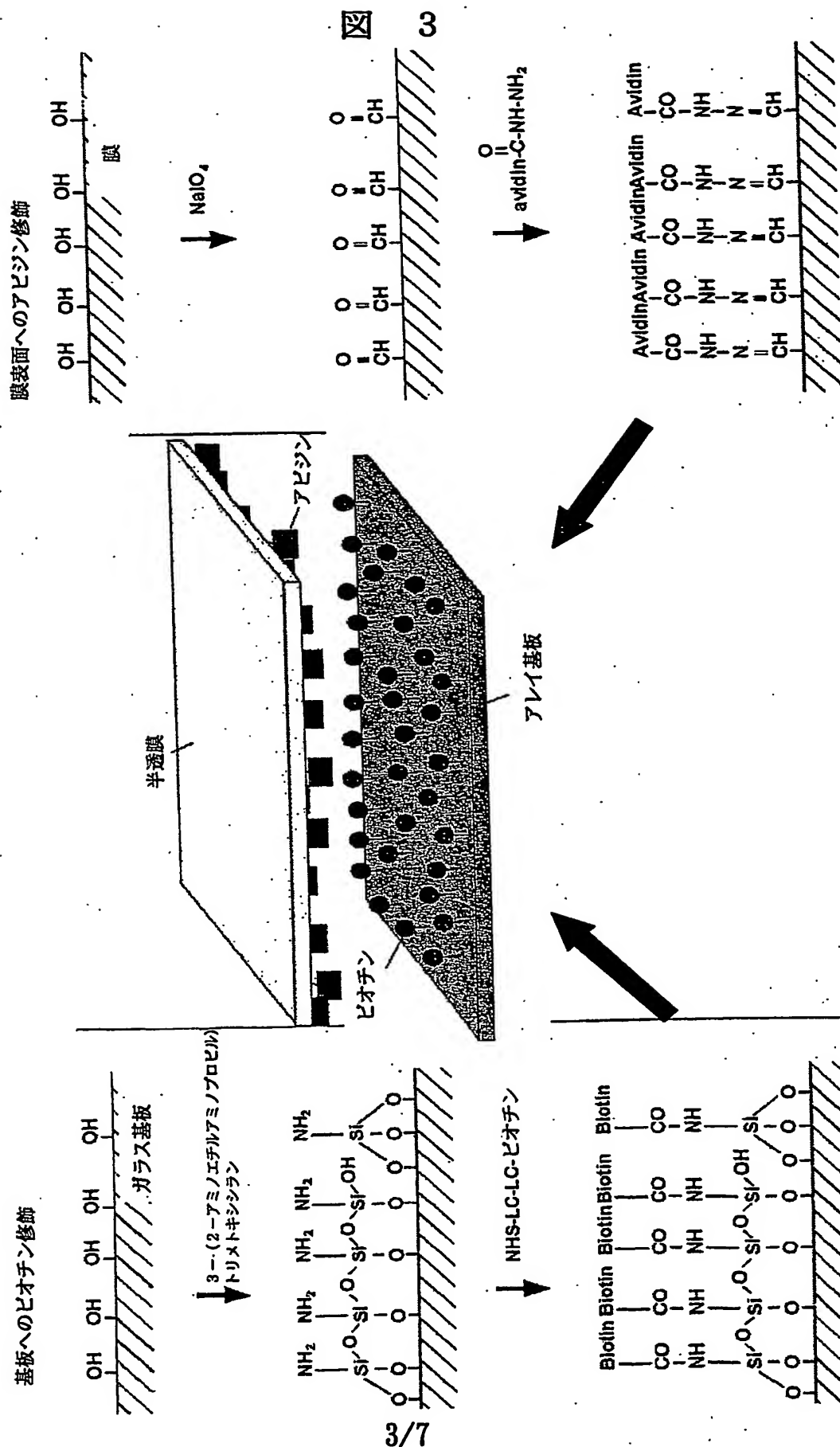


図 4

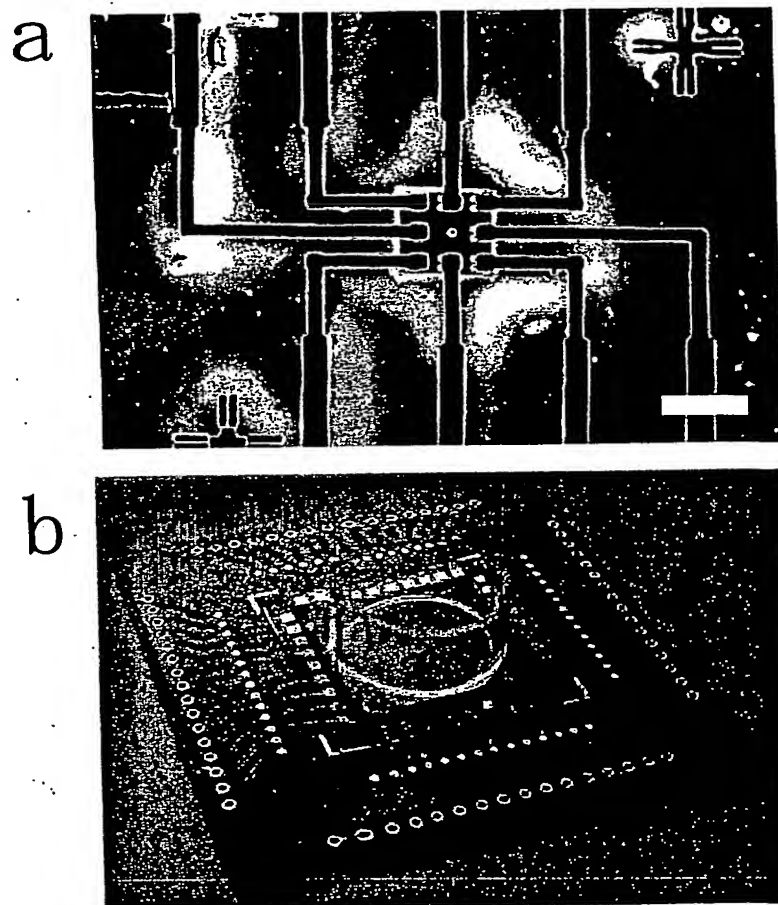
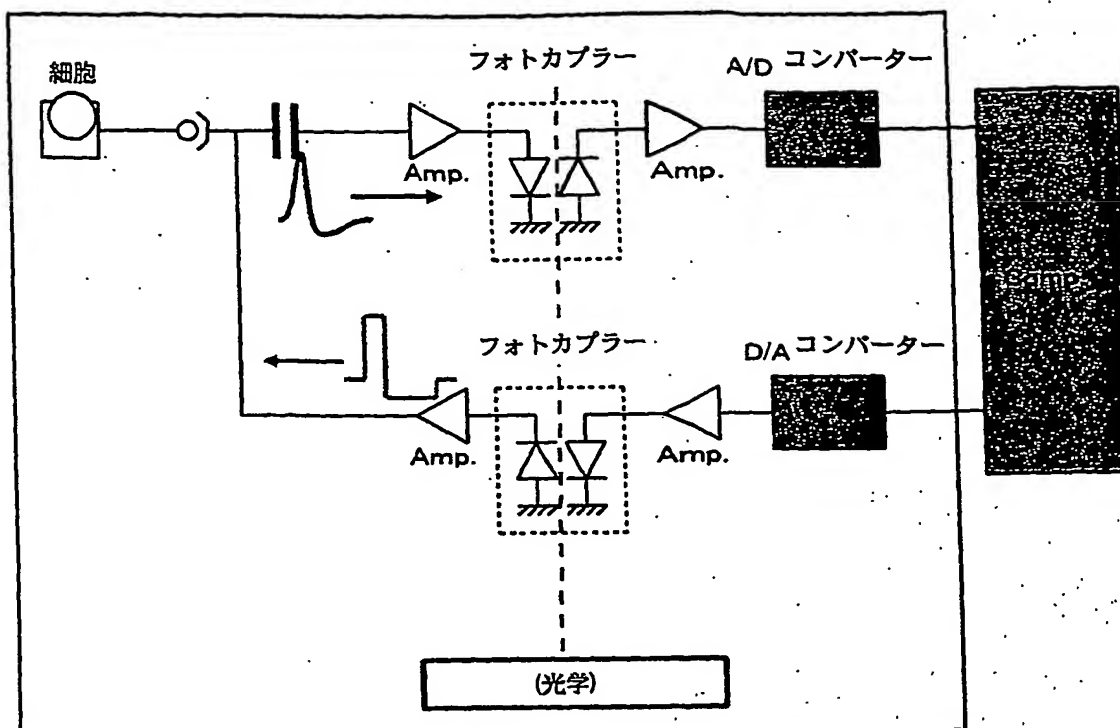


図 5

a.



b

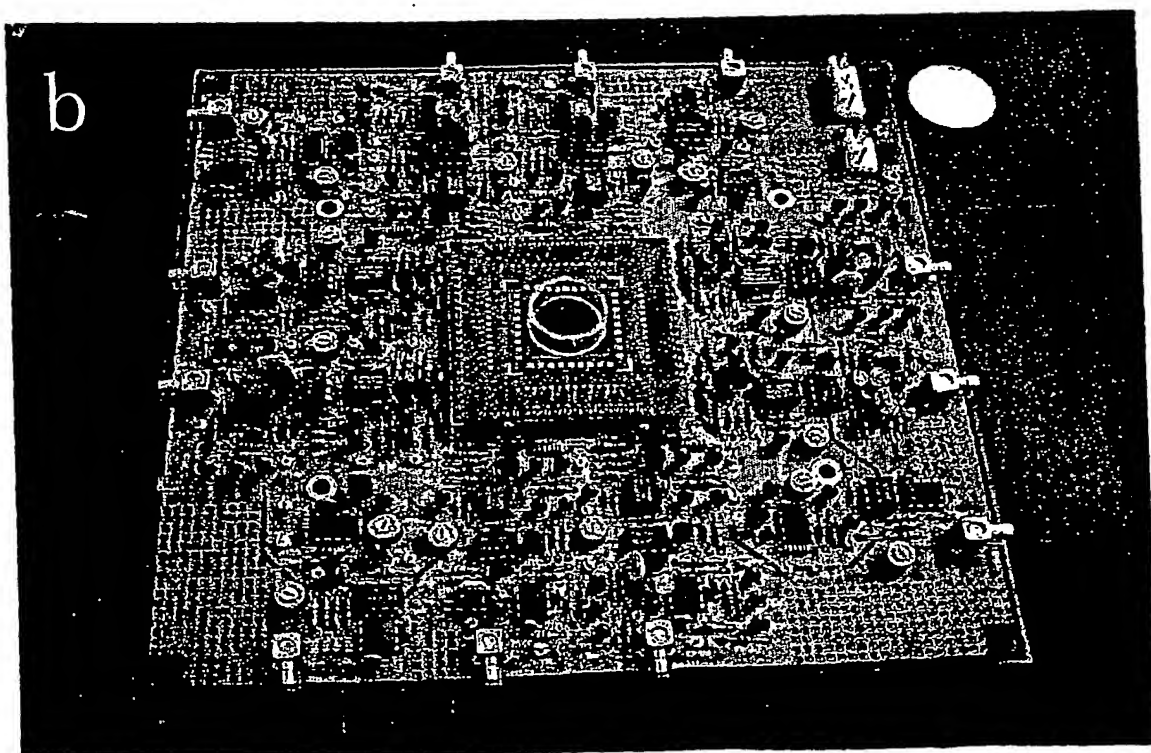


図 6

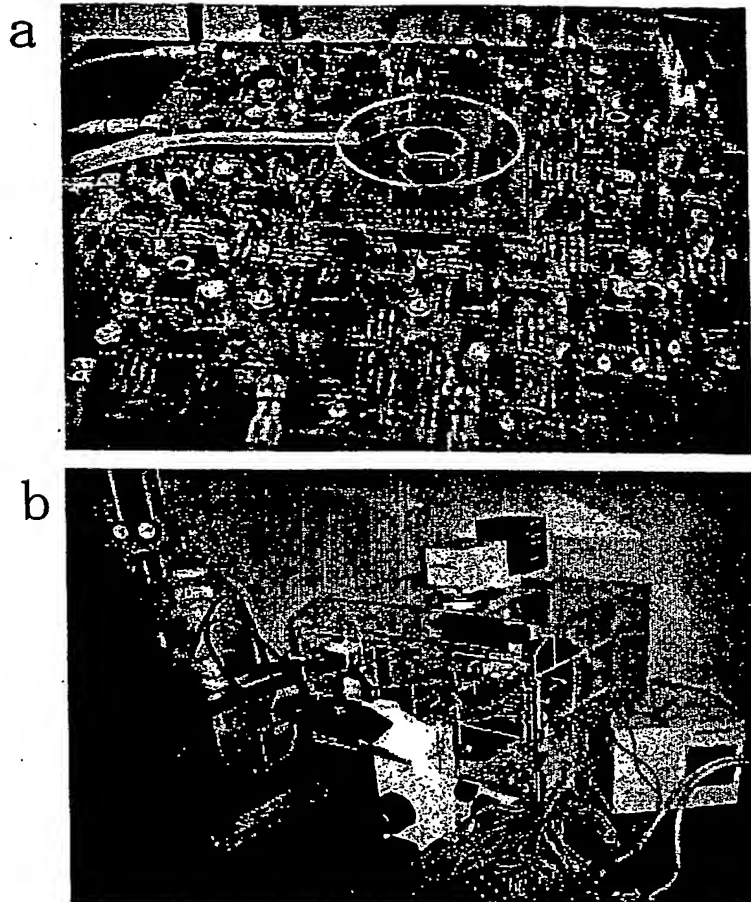
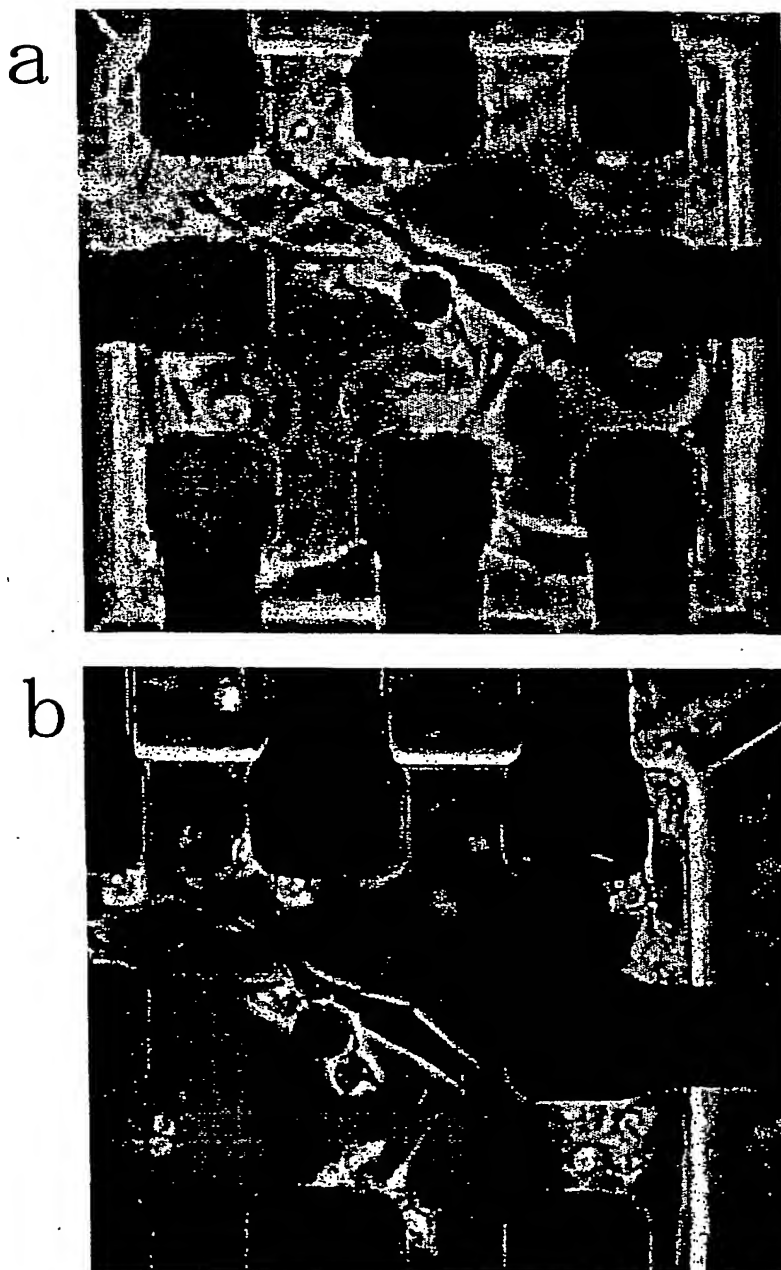


図 7



7/7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10759

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12M3/00, 1/12, 1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12M1/00-3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/34202 A1 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.), 08 July, 1999 (08.07.99), & EP 1040345 A1 & JP 11-187865 A	1-5
Y	WO 02/42411 A1 (Japan as Represented by the Head of National), 30 May, 2002 (30.05.02), & EP 1344817 A1 & JP 2002-153260 A	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 October, 2003 (29.10.03)

Date of mailing of the international search report
11 November, 2003 (11.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12M3/00, 1/12, 1/34

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12M1/00-3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 99/34202 A1 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) 1999. 07. 08 & EP 1040345 A1 & JP 11-187865 A	1-5
Y	WO 02/42411 A1 (科学技術振興事業団) 2002. 05. 30 & EP 1344817 A1 & JP 2002-153260 A	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
29. 10. 03

国際調査報告の発送日
11.11.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
小暮 道明



4N 3228

電話番号 03-3581-1101 内線 3448